

Title	超好熱古細菌由来サチライシンの新奇な成熟化機構 および優れた安定性に関する研究
Author(s)	田中, 俊一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49538
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	たなか しゅんいち 田 中 俊 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 8 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	超好熱古細菌由来サチライシンの新奇な成熟化機構および優れた安定性に関する研究 Studies on the Unique Maturation Mechanism and Superior Stability of Subtilisin from a Hyperthermophilic Archaeon
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 谷 茂 則 (副査) 教 授 福 住 俊 一 教 授 宮 田 幹 二 教 授 菊 地 和 也 教 授 高 井 義 造 教 授 伊 東 一 良 教 授 渡 部 平 司 教 授 伊 東 忍 教 授 兼 松 泰 男

論 文 内 容 の 要 旨

これまで、プロテアーゼ成熟化機構の研究モデルとして、中温細菌由来サチライシンの構造、機能が詳細に調べられてきた。その一方で、特殊な環境下で生育する微生物由来プロテアーゼに関する研究はほとんど行われていなかった。特に、超好熱菌由来プロテアーゼの構造・機能に関する研究例はなく、その成熟化機構は明らかではなかった。本研究では、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来サチライシン (Tk-subtilisin) の新奇な成熟化機構を明らかにした。また、その産業分野への実用化において大きな利点となる、優れた安定性も明らかにした。本研究内容は、超好熱菌由来プロテアーゼの構造、機能、成熟化機構を初めて解明した点と、その産業応用へ向けた具体的アプローチを行ったという点で、学術・産業の両面において意義深い。第1章では、プロペプチド切断前のPro-Tk-subtilisinのX線結晶構造解析および生化学的解析により、Ca²⁺依存的なフォールディング、安定な成熟化中間体構造の獲得、そしてプロペプチドの構造安定化による高分解耐性という、Tk-subtilisinの成熟化機構における3つの新奇性を明らかにした。また、後者2つは、過酷な高温環境下での効率的な成熟化を可能にする要因であることを提案した。次いで、第2章では、プロペプチド切断後の複合体、および分解後の活性型成熟体のX線結晶構造解析により、Ca²⁺および分子間での切断を利用した成熟体N末端領域の除去と、プロペプチドと成熟体の結合界面での立体障害形成によるプロペプチド再結合の阻害という、Tk-subtilisinの成熟化反応の不可逆性をもたらす2つの新奇な因子を明らかにした。さらに、第3章では、プロペプチド存在下、非存在下でフォールディングさせた場合の成熟体のX線結晶構造解析およびフォールディング速度の比較から、Tk-subtilisinのプロペプチドがフォールディングを促進するシャペロン機能を持つことを明らかにした。この結果から、Tk-subtilisinがプロペプチドとCa²⁺結合領域という2つのシャペロン機能を利用することで、過酷な高温環境下でのフォールディングを可能にしていることを提案した。第1章から第3章までの研究成果により、超好熱菌由来プロテアーゼとして初めて、Tk-subtilisinの成熟化機構を提唱し、また、その特徴を活かした安定的大量調製方法を確立するに至った。第4章では、Tk-subtilisinが、熱および化学変性に対して最も高い安定性を持つ

つプロテアーゼであることを明らかにし、産業利用上、非常に優れた酵素であることを証明した。その特性を活かし、産業および医療分野で問題となっている難分解性蛋白質の分解除去への応用試験を進めた。

以上のように、本論文は、これまで研究例のない超好熱由来プロテアーゼの成熟化機構を明らかにすることで、微生物の生育環境に最適化されたプロテアーゼ成熟化機構の多様性を見出した。また、多様な成熟化機構の特徴を活かすことで、プロテアーゼ活性化の任意制御が可能となることを見出した。さらに、Tk-subtilisinが、現存するプロテアーゼの代替となるだけではなく、これまで不可能であった、新たな分野へのプロテアーゼの実用化を可能にすることを立証した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来サチライシン (Tk-subtilisin) の新奇な成熟化機構と優れた安定性を明らかにした。本研究内容は、超好熱菌由来プロテアーゼの構造、機能、成熟化機構を初めて解明した点と、その産業応用へ向けた具体的アプローチを行ったという点で、学術・産業の両面において意義深い。第1章では、プロペプチド切断前のPro-Tk-subtilisinのX線結晶構造解析および生化学的解析により、Ca²⁺依存的なフォールディング、安定な成熟化中間体構造の獲得、そしてプロペプチドの構造安定化による高分解耐性という、Tk-subtilisinの成熟化機構における3つの新奇性を提案している。また、後者2つは、過酷な高温環境下での効率的な成熟化を可能にする要因であることを提案している。次いで、第2章では、プロペプチド切断後の複合体、および分解後の活性型成熟体のX線結晶構造解析により、Ca²⁺および分子間での切断を利用した成熟体N末端領域の除去と、プロペプチドと成熟体の結合界面での立体障害形成によるプロペプチド再結合の阻害という、Tk-subtilisinの成熟化反応の不可逆性をもたらす2つの新奇な因子を提案している。さらに、第3章では、プロペプチド存在下、非存在下でフォールディングさせた場合の、成熟体のX線結晶構造解析およびフォールディング速度の比較からTk-subtilisinのプロペプチドがフォールディングを促進するシャペロン機能を持つことを明らかにしている。この結果から、Tk-subtilisinがプロペプチドとCa²⁺結合領域という2つのシャペロン機能を利用することで、過酷な高温環境下でのフォールディングを可能にしていることを提案している。第1章から第3章までの研究成果により、超好熱菌由来プロテアーゼとして初めて、Tk-subtilisinの成熟化機構を提唱し、また、その特徴を活かした安定的大量調製方法を確立するに至っている。第4章では、Tk-subtilisinが、熱および化学変性に対して最も高い安定性を持つプロテアーゼであることを明らかにし、産業利用上、非常に優れた酵素であることを証明している。また、その特性を活かし、産業および医療分野で問題となっている難分解性蛋白質の分解除去への応用試験を進めている。

以上のように、本論文は、これまで研究例のない超好熱由来プロテアーゼの成熟化機構を明らかにすることで、微生物の生育環境に最適化されたプロテアーゼ成熟化機構の多様性を見出している。また、多様な成熟化機構の特徴を活かすことで、プロテアーゼ活性化の任意制御が可能となることを見出している。さらに、Tk-subtilisinが、現存するプロテアーゼの代替となるだけではなく、これまで不可能であった、新たな分野へのプロテアーゼの実用化を可能にすることを立証している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。